

# 团 体 标 准

T/CVMA 1—2018

## 口蹄疫病毒田间分离株与疫苗株抗原关系 (r 值) 测定方法

Protocol of matching test (r value) for foot-and-mouth disease virus  
field strains and vaccine strains

(征求意见稿)

XXXX- XX-XX 发布

XXXX - XX -XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

## 前 言

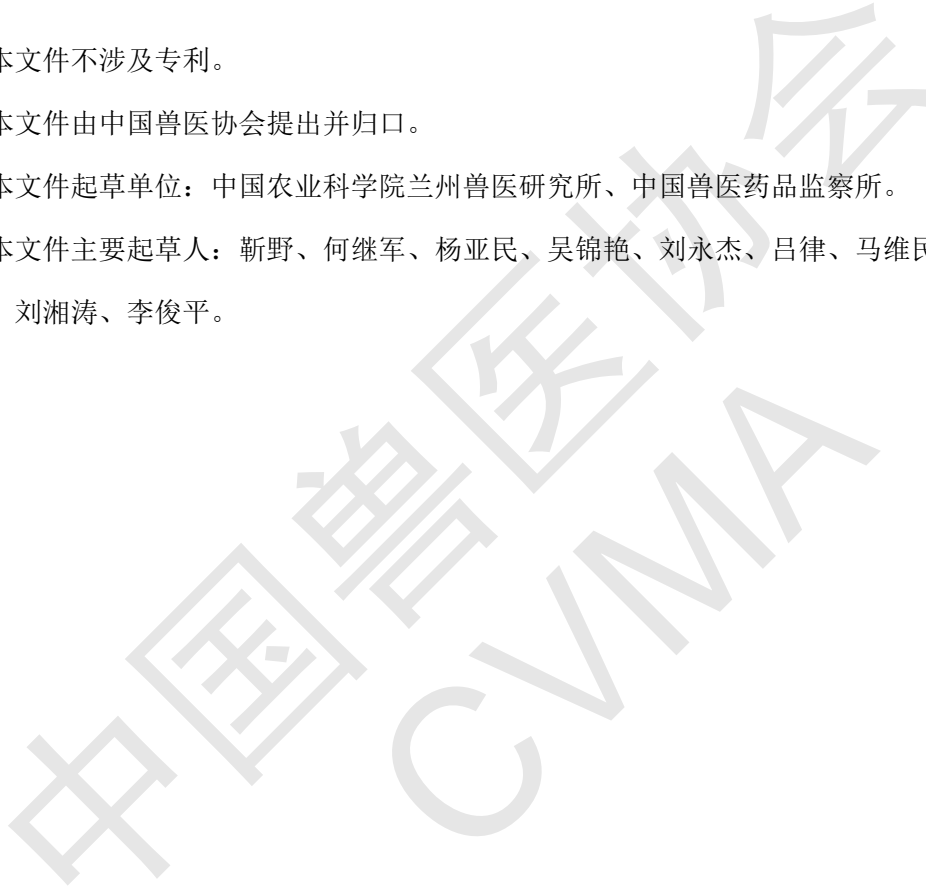
本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件不涉及专利。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院兰州兽医研究所、中国兽医药品监察所。

本文件主要起草人：靳野、何继军、杨亚民、吴锦艳、刘永杰、吕律、马维民、卢炳州、郭建宏、张强、刘湘涛、李俊平。



# 口蹄疫病毒田间分离株与疫苗株抗原关系（r 值）测定方法

## 1 范围

本文件规定了口蹄疫病毒（FMDV）田间分离株与疫苗株抗原关系（r 值）测定用试剂和器材、实验程序、试验成立条件、血清抗体滴度计算、r 值计算及结果解释。

本文件适用于评价 FMDV 田间分离株与疫苗株的抗原关系（r 值）。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 18935 口蹄疫诊断技术

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 试剂和器材

### 4.1 试剂

#### 4.1.1 胎牛血清（或新生牛血清）

培养细胞用。

#### 4.1.2 阳性对照血清

FMDV 感染动物或口蹄疫疫苗免疫动物血清，56°C 水浴灭活 30 min。

#### 4.1.3 阴性对照血清

未接触过 FMDV 的动物血清，56°C 水浴灭活 30 min。

#### 4.1.4 待检血清

待检血清经 56°C 水浴灭活 30 min。

#### 4.1.5 病毒

FMDV分别适应于BHK-21或IB-RS-2单层细胞。收获的病毒液测定TCID<sub>50</sub>后，分装于小管，-70℃保存备用。FMDV可用GB/T 18935所述方法进行血清型、毒株谱系鉴定。病毒培养实验室应符合GB 19489。

#### 4.1.6 细胞

BHK-21或IB-RS-2传代细胞，传代代次应在15代以内。

#### 4.1.7 EDTA 胰蛋白酶溶液

消化、分散细胞用。

#### 4.1.8 细胞营养液

含10%胎牛（新生牛）血清的细胞维持液（pH 7.4）（按照附录A.1配制），培养细胞用。

#### 4.1.9 细胞维持液

Eagle's-MEM与含5%水解乳蛋白的Earle's液等量混合配成（pH 7.6~7.8）（按照附录A.2配制），在中和试验中作稀释液用。

#### 4.1.10 细胞染色液

用10%福尔马林配制的0.05%亚甲基兰溶液。

### 4.2 器材

生物安全柜、恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱、恒温水浴锅、倒置生物显微镜、96孔细胞培养板、无菌试管、冻存管、微量可调移液器及配套吸头。

## 5 试验程序

### 5.1 FMDV TCID<sub>50</sub> 预测定

将FMDV在96孔培养板上作10倍连续稀释，即10<sup>-1</sup>，10<sup>-2</sup>，10<sup>-3</sup>.....10<sup>-11</sup>，每孔50 μL病毒液，100 μL细胞悬液（细胞悬液的浓度以在24 h内长满单层为度，一般每毫升100~150万个细胞），每个稀释度8孔。每块板的最后一列设8孔细胞对照，每孔补加50 μL稀释液（不加病毒）。置37℃ 5% CO<sub>2</sub> 温箱培养。观察CPE，72 h将板固定并作常规染色（先用10%福尔马林固定30 min，然后置于用10%福尔马林配制的0.05%亚甲基兰溶液中浸泡染色30 min，最后将培养板用水冲洗）。未病变细胞呈蓝色，病变细胞脱落或不着色。依据CPE情况，按Reed-Muench法计算病毒TCID<sub>50</sub>。

### 5.2 稀释血清

用细胞维持液将待检血清在培养板上从1:4开始作2倍连续稀释，每份血清至少平行稀释2排孔，每孔50  $\mu\text{L}$ 。

### 5.3 加入病毒

在上述每孔中加入50  $\mu\text{L}$ 含100 TCID<sub>50</sub>的病毒液。

### 5.4 对照设立

正常细胞对照：每块培养板上均设立2~4孔不接种病毒的正常细胞对照，每孔加入50  $\mu\text{L}$ 。

阴性对照血清：设2~4孔，每孔加50  $\mu\text{L}$ 血清及50  $\mu\text{L}$ 含100 TCID<sub>50</sub>的病毒液。

阳性对照血清：阳性对照血清和被检血清平行稀释（如：2排孔），每孔加入50  $\mu\text{L}$ 含100 TCID<sub>50</sub>的病毒液。

病毒对照：另设一块培养板测定本次试验中病毒的实际滴度（TCID<sub>50</sub>），用以计算病毒的实际使用量。

### 5.5 中和反应

封闭培养板，置37  $^{\circ}\text{C}$  培养1 h。

### 5.6 加入细胞

血清与病毒中和1 h 后，每孔加入50  $\mu\text{L}$ 细胞悬液，置37  $^{\circ}\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 温箱培养。对照孔体积不足150  $\mu\text{L}$ 时，用稀释液补全体积。

### 5.7 染色

48 h后，显微镜下预先作适当判读。第3天，将板固定，并作常规染色。

## 6 试验成立条件

正常细胞对照：在整个试验中一直保持良好的生长形态，染色呈蓝色；

阴性对照血清：阴性对照血清孔应全部出现 CPE，染色不着色；

阳性对照血清：阳性对照血清抗体滴度应在预期 2 倍以内。

病毒对照：根据试验中病毒的实际滴度（TCID<sub>50</sub>），计算病毒的实际使用量。每孔使用的病毒量应32 TCID<sub>50</sub>~320 TCID<sub>50</sub> 范围内。

当以上对照均成立时，试验有效。

## 7 血清抗体滴度计算

以血清/病毒混合物的50%终点表示血清的最终滴度，可通过Spearman-Kärber方法计算。

## 8 r 值计算及结果解释

### 8.1 r 值计算公式

$$r = \frac{\text{疫苗血清与田间流行毒株中和滴度的倒数}}{\text{疫苗血清与疫苗毒株中和滴度的倒数}}$$

### 8.2 结果解释

利用中和实验测定r值，一般认为当r值大于0.3，表明田间分离株与疫苗株相似，该毒株配制的疫苗能够保护田间流行毒株的攻击。当r值低于0.3，表明田间毒株明显不同于疫苗株，该毒株配制的疫苗不能有效保护田间流行毒；在这种情况下，应通过本动物交叉攻毒保护实验进行验证现有的疫苗对田间分离株的保护效果。

附 录 A  
(规范性附录)  
溶液配制

A.1 Eagle's-MEM

10×Eagle's-MEM营养液：Eagle's-MEM营养剂9.5g，加超纯水100.0 mL。溶解后过滤除菌。用无菌超纯水将10×营养液按1:10稀释，即100 mL营养液中加入900 mL无菌超纯水中即为使用浓度营养液，4℃保存备用。

A.2 0.5%水解乳白蛋白/Earle's液

氯化钠 (NaCl)	6.8 g
氯化钾 (KCl)	0.4 g
氯化钙 ((CaCl <sub>2</sub> ))	0.2 g
硫酸镁 (MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O)	0.2 g
磷酸二氢钠 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O)	0.14 g
葡萄糖	1.0 g
10%酚红	2.0 mL
水解乳白蛋白	5.0 g
加超纯水至	1000 mL

按配方称取各成分并逐个溶解，最后加超纯水至 1000 mL，过滤除菌。4℃保存备用。